柞蚕蛹抗菌肽D对大肠杆菌$K_{12}D_{31}$的作用

邱雪贞　屈贤铭　吴克佐　戴培桦　李士云

（中国科学院上海生物化学研究所）

摘　要

本文报道了不同浓度的柞蚕蛹抗菌肽D，对大肠杆菌$K_{12}D_{31}$的杀灭作用动力学。在LEG培养液中，抗菌肽D的浓度在5微克/毫升时显效。浓度在10微克/毫升以上时，其杀菌速度大于细菌的增殖速度。固定抗菌肽浓度为10微克/毫升，细菌浓度在3×10^7个细菌/毫升，培养在磷酸钾盐缓冲液中，4小时后能全部杀灭。同样浓度细菌在LEG培养液中，4小时后细菌数下降到约为10^2个细菌/毫升，但不能全部杀灭。同时还提供了柞蚕蛹抗菌肽D和B对大肠杆菌$K_{12}D_{31}$作用不同时间的电镜照片。

关键词　柞蚕　抗菌肽　抗菌活性　大肠杆菌

经大肠杆菌或其它非致病菌可以诱导多种昆虫产生抗菌蛋白或抗菌多肽。Boman（1981）、Hoffmann（1981）等已报道了在多种鳞翅目昆虫中都能诱导产生抗菌肽，Okada（1983）以刺伤棕尾别麻蝇（*Sercophage pergrina*）的体壁可以诱导抗菌肽（Sarcotoxin），Boman(1983, 1982)实验室则以美国天蚕（*Hyalophora cecropia*）为材料，经非致病菌诱导可以产生抗菌蛋白(Attacin) A—F，抗菌肽(cecropin A-G)，而我们实验室以柞蚕蛹为材料，经诱导后可以观察到抗菌蛋白及抗菌肽A、B、D、E等组份（张双全等，1985）。而家蚕蛹经诱导后，经分离可分得六个组分的抗菌肽（屈贤铭等，1986），分别称为CM_{I}、$CM_{II}Ph_1$、$CM_{II}Ph_2$、CM_{III}、CM_{IV}及CM_{V}，它们都有杀死大肠杆菌某些株系的作用。抗菌肽在昆虫的免疫防卫系统中，可能是一类重要组成部分，经刺激诱导后，好多昆虫品种都能产生这类碱性抗菌多肽，也进一步说明了这类物质在清除非我物质中，可能是处于重要地位。

我们曾以不同比例的磷脂酰丝氨酸或磷脂酰胆碱组成的脂小泡为模型。观察了抗菌肽D和B对脂小泡的渗漏和结合作用（未发表的工作）。本文报道了柞蚕蛹抗菌肽D及B对大肠杆菌$K_{12}D_{31}$的作用及电镜观察。

本文1985年8月12日收到，1985年10月22日收到修改稿。

材料和方法

柞蚕蛹抗菌肽D和B的制备，按Qu Xian-ming（1982）描述方法制备。柞蚕蛹抗菌肽D贮备液为500微克/毫升，经消毒过的0.45微米的微孔滤膜过滤。备用。

大肠杆菌$K_{12}D_{31}$，由斯德哥尔摩大学微生物系赠送，细菌培养于LEG培养基中（Bertani，1951）37°C振荡培养约3小时，菌数达10^8个/毫升，以LEG培养液作空白对照，在600毫微米处吸收OD约0.85—0.95。

LEG培养液，2.1克tryptone（Oxoid）1.5克yeast extract（Oxoid），2.1克NaCl加蒸馏水到250毫升，15磅（121°C）消毒20分钟，冷却后再加入消毒过的$E+B_1\times50$溶液5毫升，20%葡萄糖溶液2.5毫升。

$E+B_1\times50$溶液：670毫升蒸馏水，10克$MgSO_4\cdot7H_2O$，100克$C_6H_8OH\cdot H_2O$，500克K_2HPO_4，175克$NaNH_4HPO_4\cdot4H_2O$溶解后加水至1000毫升。用250毫升锥形瓶分装，每瓶90毫升，高压消毒20分钟，冷却后，每瓶再加入已灭菌过的维生素B_1溶液0.45毫升。维生素B_1溶液的浓度为10毫克/毫升。

营养琼脂，上海医化所产品。

固体培养基，按营养琼脂的用法配制，消毒。并用灭菌操作置于已消毒过的培养皿中，皿的直径为9厘米，每只放15毫升左右，凝固后备用。

细菌生长情况的测定，采用活菌计数法。将被检菌液作一系列稀释后，取0.1毫升的原液或稀释液涂布于盛有固体培养基的培养皿内。在37°C培养过夜，每个活细菌将发育成为一个菌落。次日计算培养皿内菌落数就可以推算出活细菌的总数。从而知道杀菌肽对细菌的杀菌作用。

电镜观察，经过不同时间培养的细菌悬浮液，点在火棉胶碳膜铜网，用磷钨酸(PTA)1%负染，在日立电镜H—300上观察、照相。

实　验　与　结　果

（一）不同浓度抗菌肽D对大肠杆菌的作用

大肠杆菌$K_{12}D_{31}$接种于LEG培养液中，37°C振荡培养约3小时，此时为细菌对数生长期，菌数约有5×10^8个/毫升，取0.1毫升细菌液，分别加到每毫升含有柞蚕蛹抗菌肽D0.5、1、2、3.5、5、10、20微克的10毫升的LEG培养液中，振荡培养。培养到30分、1小时、2小时、4小时，分别取出培养液0.1毫升，加消毒生理盐水0.9毫升，依次同样倍数稀释，直至将原液稀释至10^{-6}。取各次稀释的稀释液0.1毫升，分别涂布在含固体培养基的培养皿中，然后在37°C培养过夜。次日计算培养皿内的菌落数，来推算出活菌的总数，从而知道抗菌肽对细菌的杀菌作用。结果见图1。从图1可见抗菌肽D的浓度低于5微克/毫升时，杀菌作用效果不明显。这由于培养液中抗菌肽含量虽能杀死部分细菌，而在此培养条件下，未被杀死的细菌仍能以对数指数繁殖，也就是说，杀死细菌的速度不及增殖速度。因此杀菌效果不能明显反映。抗菌肽浓度在5微克/毫升

时，可以显示其效果，在此培养液中，细菌虽以对数指数增殖，但其杀死细菌的量大于增殖的细菌。当抗菌肽的浓度在10微克/毫升以上时，4小时内杀死细菌的速度大于增殖速度。则细菌数以对数指数直线下降。但培养到第二天既使抗菌肽的浓度在20微克/毫升，细菌却大量繁殖了。说明抗菌肽在一定浓度下，虽能大量杀死大肠杆菌，但若未被全部杀灭，只要留下几个活的细菌，在此培养条件下，仍能大量增殖。

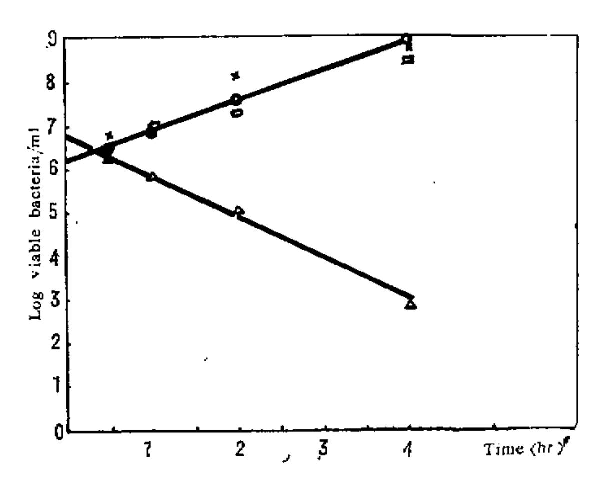


Fig. 1　Effect of different concentration of cecropin D from Antheraca pernyi on suspensions of *E.coli* $K_{12}D_{31}$ in LEG medium

-×-×-×-　*E.Coli* incubated without cecropin D

-○-○-○-　*E.Coli* incubated with 2 μg/ml of cecropin D

-□-□-□-　*E.Coli* incubated with 5 μg/ml of cecropin D

-△-△-△-　*E.Coli* incubated with 10μg/ml and 20μg/ml of cecropin D

（二）同一浓度抗菌肽D，在不同培养液中的杀菌作用。

我们已经观察到在LEG培养液内，柞蚕蛹抗菌肽D的浓度在10微克/毫升时，在一定时间内，杀死细菌的速度大于增殖速度，它能较有效地杀死细菌，为此我们比较了它在磷酸钾盐缓冲液及LEG培养液中，对大肠杆菌的杀灭作用。结果见图2。

从图2可见，在培养液中不含抗菌肽D时，原有10^7个细菌/毫升的细菌，无论在磷酸钾盐缓冲液，或在LEG培养液中，2小时后细菌都已增殖到10^8个细菌/毫升。4小时以后都已长到～10^9个细菌/毫升的细菌。但当培养液内含有10微克/毫升抗菌肽D时2小时后，在LEG培养液中细菌数下降到10^5个细菌/毫升。在4小时后，下降到10^3个细菌/毫升。而在磷酸钾盐缓冲液中，情况就不一样。由于加入细菌时，含有一定量LEG培养液。因此在磷酸缓冲液中还能增殖。但毕竟由于营养成分有限，因而细菌增殖速度就不如在LEG培养液中了。在2小时以后仅残留10^4个细菌/毫升，在4小时时，已经检查不到细菌。过夜后也未见细菌的增殖。说明在磷酸钾盐缓冲液中的细菌已全部被杀死。

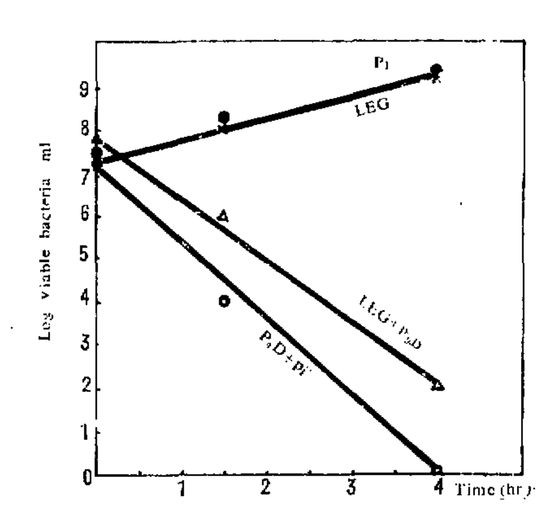


Fig. 2 Effect of cecropin D (10μg/ml) on suspensions of *E. Coli* $K_{12}D_{31}$ in either LEG medium or O. *1M* potassium phosphate buffer

-●-●- The suspension of *E.Coli* in potassium phosphate buffer incubated without cecropin D

-×-×- The suspension of *E.Coli* in LEG medium incubated without cecropin D

-○-○- The suspension of *E. Coli* in potassium phosphate buffer with 10μg/ml of cecropin D

-△-△- The suspension of *E. Coli* in LEG medium with 10μg/ml of cecropin D

（三）抗菌肽D和B对大肠杆菌$K_{12}D_{31}$作用后的电镜观察。

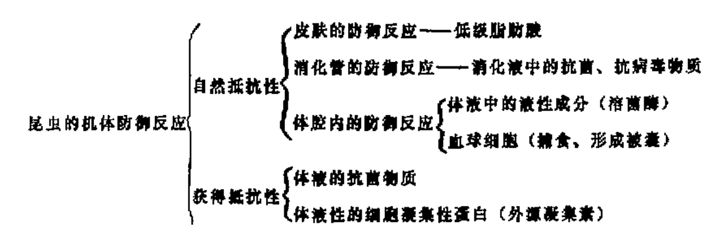
上面的实验说明，抗菌肽D对大肠杆菌$K_{12}D_{31}$的作用，并非一般抑菌而是杀死细菌。我们进一步观察抗菌肽D和B对大肠杆菌作用后的电镜情况。约含1.5×10^{6}个细菌/毫升大肠杆菌的LEG培养液中，分别加入经纯化抗菌肽D和B，使其浓度约为50微克/毫升，在37°C温度下，振荡培养45分钟后取样，滴入铜栅网、磷钨酸反染后，进行电镜观察。从对照组的照片可见，细菌多数为二个细菌或更多细菌团集在一起（图3 A）。这和Haltmark等（1983）在相差显微镜下观察的情况相似。在此条件下，含抗菌肽D的，未见有明显的变化（图3 B）。而含有抗菌肽B的，细菌外膜已被明显的破坏了（图3 C）。培育2.5小时后，含有抗菌肽D的培养液中的细菌外膜也已被明显的破坏了（图3 D）。这也说明抗菌肽B的杀菌效率比抗菌肽D高。

讨　论

随着免疫生物学的发展，不仅把机体防御注意力集中于在以免疫球蛋白为基础的免疫学方面，而且进一步扩大视野加以研究，着眼于无脊椎动物的机体防御机制。特别是从比较免疫生物学方面来看，把位于动物分化系统先端的哺乳动物和昆虫的机体防御机制加以比较，探讨其异同之处，这是很有意义的。

昆虫对侵入体内的病原微生物的防御反应可以归纳如表（岩花秀典，1982）

昆虫对病原微生物的防御反应



昆虫的机体防御反应大致可以分为自然抵抗性和获得抵抗性两类。这里所说的获得抵抗性，不同于脊椎动物免疫学上所说的获得免疫，在异物侵入体内时，未见到淋巴细胞的增殖分化，免疫球蛋白的生成、对异物反应的特异性以及记忆免疫等，而是当有异物侵入后，诱导产生的抗菌物质和凝集素等。

目前抗菌肽对细菌的作用机理虽不清楚，但从本文的结果来看，它是杀死细菌。由于各种经诱导后昆虫的抗菌肽一级结构已经测定，N端亲水，C端疏水，而在pH 1.7—11.7范围内抗菌肽D亦呈无规卷曲构象。我们以脂小泡作为模型实验（未发表的工作），观察到抗菌肽能使脂小泡发生渗漏，这可能是以一端插入细菌的细胞膜，形成一个通道，使细菌外膜破裂。从电镜照片中，可见到经抗菌肽作用后的细菌外膜，先有一些缺陷，然后外膜破裂。这种作用可能是一个或数个抗菌肽分子接合到细菌膜上。因而抗菌肽浓度必须达到一定的浓度才能有效。

Hultmark等（1982）报道美国天蚕中的抗菌肽对某些细菌作用的效率B＞A≫D，从本文的结果，在同样浓度的抗菌肽存在下，抗菌肽B和细菌作用45分钟后，细胞膜已明显破坏，但在同样条件、同样浓度的抗菌肽D，细胞膜没有明显的变化，说明柞蚕蛹抗菌肽B的杀菌效率确实比抗菌肽D大。

参 考 文 献

屈贤铭 吴克佐 邱雪贞 张双全 李士云 1986 家蚕蛹经聚肌胞核苷酸诱导其血淋巴中六种抗菌肽的分离与鉴定。生物化学与生物物理学报 18:284

张双全 屈贤铭 戚正武 1985 不同诱导源对柞蚕蛹血淋巴及性腺体中抗菌物质产生的影响。生物化学杂志

岩化秀典 1982 昆虫对病原微生物的防御反应 化学と生物。20 (197)：586—587

Boman. H G. and Hultmark D. 1981 Cell-free immunity in insects. *Trends Biochemical Sciences.* 6 :306

Bertani.G. *et al.* 1951 Studies on Lysogenesis I. The mode of phoge liberotion by lysogenic Escherichia coli. *J. Bacteriol* 62:293-300

Hoffmann, D., Hultmark, D. and Boman, H. G. 1981 Insect Immunity: Galleria mellonella and other lepidopetra have cecropin like facters active against gram-regative bacteria. *Insect Biochem.* 11(5): 537-548

Hultmark. D. Engstróm. Å. Bennich, H. Kapur. R and Boman. H. G. 1982 Insect Immunity: Isolation and strecture of cecropin D and four minor antibacterial components from cecropia pupae. *Eur. J. Biochem.* 127: 207-217

Hultmark. D., Engstróm. Å. Andersson K. Steiner H. Bennicl H., and Boman. H. 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from Hyalophora cecropia. *The EMBO. J.* 2: 571-576

OKADA. M., and Natori. S. 1983. Purification and Characterization of an antibacterial protein from heamolymph of Sarcophaga peregrina (flesh-fly) larvae, *Biochem. J.* 211: 727-734

Qu. X. M., Steiner. H. Engstrom Å. Bennich. H. and Boman. H. 1982 Insect Immunity; Isolation and Structure of Cecropin B and D from pupae of the chinese. Oak silk Moth, Antheraea pernyi. *Eur. J. Biochem* 127: 217—224

THE EFFECT OF CECROPINS D FROM *ANTHERAEA PERNYI* ON SUSPENSIONS OF *E.COLI* $K_{12}D_{31}$

Qiu Xuezhen Qu Xianming Wu Kezuo Dai Peihua Li Shiyun

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

The kinetics of the bacteriolytic effect on *E.coli* K_{12} D_{31} were studied at different concentrations of cecropin D from *Antheraea pernyi*. The effect of 5 μg per ml cecropin D on Suspensions of *E. Coli* $K_{12}D_{31}$ (10^7 cells/ml) in LEG medium was noticeable. In that medium, When the concentration of cecropin D reached 10μg per ml, the bactericibal velocity was higher than proliferation of bacterial cells As cecropin D was added to the suspension until its concentration reached 10μg per ml and with 10^7 cells/ml of *E.coli* $K_{12}D_{31}$, the number of surviving bacteria was counted by spreading on agar plates. It was found that after 4 hrs of incubation in 0.1 *M* potassium phosphate buffer these were no surivals but in LEG medium the bacterial population was 10^2 cells/ml. *E.coli* $K_{12}D_{31}$ which was incubated with cecropin D or B for different periods was observed in the electron microscope.

Key words *Antheraea pernyi* Antibacterial peptides Antibacterial activity *E. Coli*

Qiu Xuezhen *et al.*: The effect of cecropins D from *Antheraea pernyi* on suspensions of *E. coli* K_{12} D_{31}

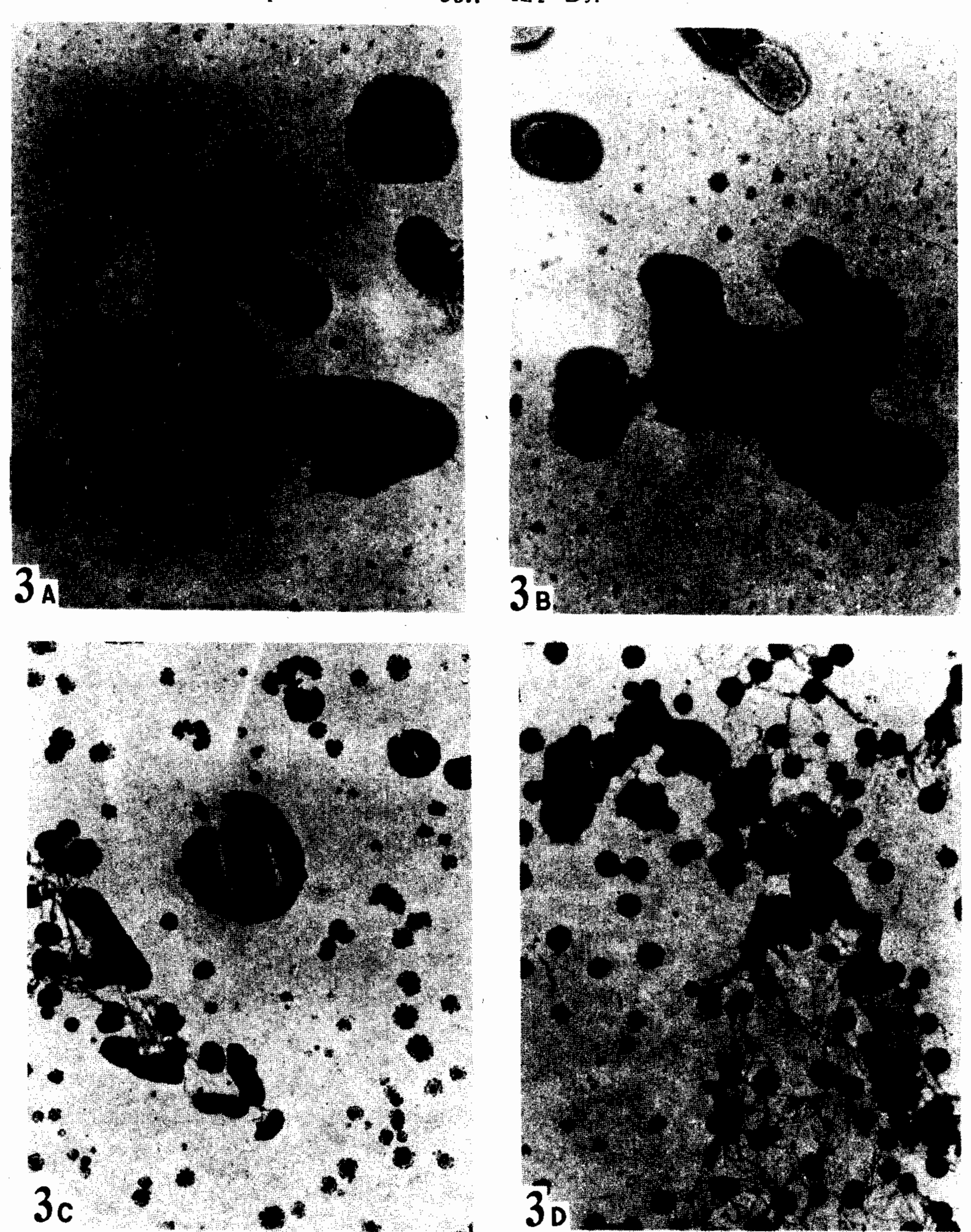


Fig. 3 Etectron micrographs of *E. coli* K_{12} D_{31} which was incubated with cecropin D or B for different periods

Fig 3A *E. coli* $K_{12}D$ 31 incubated without cecropin D

Fig 3B *E. coli* $K_{12}D_{31}$ incubated with 50μg/ml of cecropin D for 45 min, in LEG medium

Fig 3C *E. coli* $K_{12}D_{31}$ incubated with 50μg/ml of cecropin B for 45 min. in LEG medium

Fig 3D *E. coli* $K_{12}D_{31}$ incubated with 50μg/ml of cecropin D for 2.5 hr. in LEG medium